



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Pat ntschrift
⑩ DE 195 48 301 C 1

⑤① Int. Cl.⁸:
A01 H 5/00
A 01 H 1/06
C 12 N 15/82
C 07 K 16/12
A 01 N 63/00
A 61 K 39/395

⑳ Aktenzeich n: 195 48 301.4-23
㉔ Anmeldetag: 22. 12. 95
㉕ Offenlegungstag: —
㉖ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 27. 2. 97

DE 195 48 301 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

㉗ Patentinhaber:
Düring, Klaus, Dr., 06507 Gernrode, DE

㉘ Erfinder:
gleich Patentinhaber

㉙ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
NICHTS ERMITTELT

㉚ Inhibition von Signalmolekülen durch bindende oder katalytische Antikörper

㉛ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Inhibition von Signalmolekülen, die zwischen ein- und/oder vielzelligen Organismen ausgetauscht werden, speziell von Signalmolekülen von Pathogenen durch bindende oder katalytische Antikörper, d. h. von Signalmolekülen in Pflanze-Bakterien-Interaktionen oder anderen Wirt-Pathogen-Interaktionen. Eine besondere Ausführungsform besteht in der Inhibition des Signalmoleküls HSL in Pflanze/Mikroorganismus-Interaktionen, indem die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern gegen HSL oder dessen wesentliche Strukturmerkmale in Pflanzenzellen transformiert wird und auf der Basis dieser Zellen transgene Pflanzen gezüchtet werden.

DE 195 48 301 C 1

Die Erfindung betrifft in Verfahren zur Inhibition von Signalmolekülen, die zwischen ein- und/oder vielzelligen Organismen ausgetauscht werden, speziell von Signalmolekülen von Pathogenen durch bindende oder katalytische Antikörper, d. h. von Signalmolekülen in Pflanze-Bakterien-Interaktionen oder anderen Wirt-Pathogen-Interaktionen. Unter Interaktionen zwischen zwei Organismen wird dabei sowohl die Wechselwirkung als auch die Kommunikation untereinander verstanden.

Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Landwirtschaft, insbesondere die Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten, aber auch die Human- und Veterinärmedizin.

Weltweit geht Jahr für Jahr ein großer Teil der Ernte durch Pflanzenkrankheiten verloren. Die Verluste insbesondere durch bakterielle Erkrankungen, u. a. von Kartoffeln, Mais, Reis und Getreide, sind erheblich. Sie betragen z. B. im Jahre 1980 bei Infektionen von Kartoffeln durch das Bakterium *Erwinia carotovora* weltweit ca. 100 Mio \$. Die dadurch bedingten Ausfälle liegen im mittleren Europa bei ca. 1–3%, in tropischen und subtropischen Klimazonen bei 30–100%.

Die von Bakterien ausgelösten Pflanzenkrankheiten sind meist durch klassische Züchtung nicht bekämpfbar, da es fast keine Resistenzmerkmale gibt. Insbesondere gilt dies für die Kartoffel sowie viele Gemüsearten oder z. B. Reis.

Für die Entstehung von bakteriell bedingten Pflanzenkrankheiten ist folgender Ablauf nachgewiesen: Pflanzeninfizierende Bakterien dringen in Verwundungsstellen im Pflanzengewebe ein und vermehren sich dort, bevor sie Krankheitssymptome hervorrufen. Im Fall des Bakteriums *Erwinia carotovora* ist gezeigt worden, daß die zellwandabbauenden Enzyme, die letztendlich für die Ausbildung der Krankheitssymptome verantwortlich sind, generell nur auf niedrigem Niveau hergestellt werden. Ebenso wird vom Bakterium ein Molekül der Substanzklasse Homoserinlacton (HSL) produziert. Das HSL dient dem Bakterium als Signalmolekül, um die aktuelle Dichte der Bakterienpopulation im Habitat zu erfassen. Nur wenn ausreichend hohe Bakterienzahlen vorhanden sind und eine Grenzkonzentration des HSL erreicht wird, so wird die Kaskade der zellwandabbauenden Enzyme schlagartig sehr stark induziert und das Pflanzengewebe dadurch massiv abgebaut. Dem HSL aus *Erwinia carotovora* sehr eng verwandte Substanzen mit gleicher Grundstruktur sind mittlerweile in einer Reihe anderer Bakterien nachgewiesen worden. Eine Verhinderung der Ansammlung dieses Moleküls in den Zellzwischenräumen der Pflanzen wird zur Unterbindung der Pathogenität des Bakteriums und der Ausbildung von Krankheitssymptomen führen.

Antibakterielle Resistenzstrategien mit gentechnischen Methoden sind bisher noch wenig untersucht. Insgesamt läßt sich feststellen, daß eine erfolgreiche spezifische Bekämpfung von bestimmten bakteriell bedingten Pflanzenkrankheiten bis heute noch nicht gelungen ist. Bisher konnte nur eine Unspezifische, generell gegen Bakterien gerichtete Resistenz durch gentechnische Veränderung von Pflanzen erreicht werden. Diese Resistenz wird durch Lyse der eingedrungenen Bakterien bewirkt.

Ziel der Erfindung ist die Inhibition von Signalmolekülen in Interaktionen zwischen zwei Organismen, spe-

ziell in Pflanze-Pathogen-Interaktionen zur Bekämpfung von bakteriellen Pflanzenkrankheiten. Die Erfindung hat u. a. die Aufgabe, Signalmoleküle in Pflanzen, die für die Induktion der Pathogenitätsfaktoren von phytopathogenen Bakterien verantwortlich sind, durch bindende oder katalytische Antikörper zu inhibieren.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Der Grundgedanke besteht darin, Signalmoleküle, die zwischen ein- und vielzelligen Organismen ausgetauscht werden, speziell Signalmoleküle von Pathogenen, durch bindende oder katalytische Antikörper zu inhibieren. Im Falle von Pflanze/Mikroorganismus-Interaktionen wird die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern gegen Signalmoleküle oder deren wesentliche Strukturmerkmale in Pflanzenteile transformiert, danach werden transgene Pflanzen mit Pathogenresistenz gezüchtet. Ein bevorzugtes Signalmolekül in solchen Interaktionen ist HSL. Es genügt auch, Antikörper gegen wesentliche Strukturmerkmale des HSL bzw. gegen den zugrundeliegenden Homoserinlactonring einzusetzen.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Inhibition durch Antikörper-ähnliche Proteine, d. h. Proteine, bei denen hypervariable Regionen (CDRs), die die Spezifität eines Antikörpers ausmachen, auf ein anderes, stabiles Proteingerundgerüst übertragen worden sind.

Zum Umfang der Erfindung gehören auch pathogenresistente transgene Pflanzen, die nach Transformation der Zellen mit dem genetischen Material gezüchtet worden sind.

Das Verfahren zur Züchtung der pathogenresistenten transgenen Pflanzen erfolgt in folgenden Schritten:

1. Herstellung von Anti-HSL-Antikörpern
2. Isolierung der genetischen Informationen für Anti-HSL-Antikörper
3. Gentransfer in Pflanzenzellen
4. Züchtung der Pflanze.

Dieses Verfahren wird im folgenden näher erläutert: Antikörper werden durch Selektion aus durch Fusion hergestellten Hybridomakulturen von immunisierten Mäusen bzw. durch Selektion in Phage Display Verfahren isoliert. Die Selektion bindender Antikörper erfolgt mit dem Antigen (dem zu inhibierenden Signalmolekül) und wird auf höchste Affinität zum Antigen ausgelegt. Katalytische Antikörper werden durch Selektion mit aus der Degradationsreaktion (z. B. Ringöffnungsreaktion für Homoserinlacton) abgeleiteten Übergangszustand-analogen organischen Molekülen als Antigen isoliert. Hierbei erfolgt die Selektion auf möglichst effektiven Abbau des Antigens.

Aus den Hybridomen wird durch Isolierung der Gesamt- und daraus der mRNA und deren Umschreiben in cDNA die korrespondierende DNA-Sequenz für die monoklonalen Antikörper erhalten. Aus dem Phage Display Verfahren steht direkt das selektierte Antikörper-Gen in Form eines einkettigen Antikörpers durch Ausschneiden aus dem Phagenplasmid zur Verfügung.

Die Gene für vollständige monoklonale Antikörper bzw. das Gen für einen einkettigen Antikörper werden unter der Kontrolle eines (bzw. zweier) in Pflanzen aktiver Promotoren in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert. Um den Transport des Antikörpers in der transgenen Pflanze in die Interzellularräume zu ermöglichen, wird an das 5'-Ende jeweils eine DNA, die für ein Signalpeptid codiert, angehängt. Diese kann aus der Maus selbst oder aus einem anderen Organismus stam-

men. Der fertige Vektor enthält alle in die Pflanzen zu transferierende DNA-Sequenzen. Daraus werden die notwendigen Gene in Pflanzen transferiert. Alternativ können die beiden Gene eines monoklonalen Antikörpers auch getrennt in zwei Pflanzentransformationsvektoren eingebaut, getrennt in Pflanzen transferiert und später durch Kreuzung zusammengeführt werden.

Die Transformation von Pflanzen kann mit allen geeigneten Verfahren (z. B. mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* oder durch direkten Gentransfer oder mit Hilfe der Partikelkanone) durchgeführt werden.

Der Einbau der Antikörper-Gene in der transgenen Pflanze wird durch geeigneten Restriktionsverdau der isolierten genomischen Pflanzen-DNA und nachfolgende Southern Hybridisierung analysiert und nachgewiesen. Die Transkription der Gene in mRNA wird vom Northern Blot nachgewiesen. Die Translation der Gene in aktives Protein wird durch Western Blot und durch verschieden aufgebaute ELISA-Tests untersucht und nachgewiesen. Das Vorhandensein des Proteins und dessen biologische Aktivität kann dadurch bewiesen werden.

Der biologische Effekt des in der Pflanze exprimierten Antikörpers wird auf molekularer und phytopathologischer Ebene nachgewiesen. Die Bindung bzw. der katalytische Abbau des Signalmoleküls kann in einem *in vitro* System (Inkubation von Pathogen mit dem gereinigten Antikörper) durch Nachweis der verbleibenden freien Konzentration von Signalmolekül bewiesen werden. Darüberhinaus kann der Nachweis durch die Inhibition der biologischen Funktion des Signalmoleküls in einem *in vivo* Experiment erfolgen.

Die selben Experimente werden mit aus der transgenen Pflanze extrahiertem Antikörper durchgeführt, um die Gleichartigkeit der Wirkungsweise zu belegen.

Als abschließender Beweis für die Funktionalität der Antikörper in der Pflanze wird die gesteigerte Resistenz der transgenen Pflanze nach Infektion mit dem Pathogen nachgewiesen. Dazu werden geeignete Pflanzenexplantate oder ganze Pflanzen mit dem Pathogen infiziert und der Krankheitsverlauf nachverfolgt. Im Vergleich zur Kontrollpflanze, die den Antikörper nicht herstellt, muß eine reduzierte Anfälligkeit festgestellt werden.

Dadurch wird erstmalig ermöglicht, in die Signalkette zwischen Pflanzenwirt und pathogenem Bakterium einzugreifen. Die bindenden oder katalytischen Antikörper werden in den neu gezüchteten transgenen Pflanzen während des Wachstums exprimiert und in deren Interzellularräume transportiert. Eine Anwendung kann für alle Pflanzenkrankheiten erfolgen, insbesondere bei denen, bei denen HSL eine Signalmolekülrolle spielt. Das ist u. a. bei Pflanzeninfektionen durch Bakterien der Gattungen *Erwinia*, *Pseudomonas* und *Xanthomonas* der Fall.

Die Bakterien werden dabei nicht abgetötet, aber eine Pathogenität unterbunden und damit die Vermehrung mangels Nährstoffen sehr stark eingeschränkt, so daß keine Krankheitssymptome mehr auftreten können.

Patentansprüche

1. Inhibition von Signalmolekülen von Pathogenen in Pflanze/Mikroorganismus-Interaktionen durch bindende oder katalytische Antikörper bzw. durch Antikörper-ähnliche Proteine.
2. Inhibition von Signalmolekülen in Pflanze/Mikroorganismus-Interaktionen nach Anspruch 1, da-

durch gekennzeichnet, daß die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern gegen Signalmoleküle oder deren wesentliche Strukturmerkmale in Pflanzenzellen transformiert wird und auf der Basis dieser Zellen transgene Pflanzen gezüchtet werden.

3. Inhibition des Signalmoleküls HSL in Pflanze/Mikroorganismus-Interaktionen nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern gegen HSL oder dessen wesentliche Strukturmerkmale in Pflanzenzellen transformiert wird und auf der Basis dieser Zellen transgene Pflanzen gezüchtet werden.

4. Inhibition des Signalmoleküls HSL in Pflanze/Mikroorganismus-Interaktionen nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern gegen den Homoserinlactonring oder dessen Derivate in Pflanzenzellen transformiert wird und auf der Basis dieser Zellen transgene Pflanzen gezüchtet werden.

5. Pathogenresistente transgene Pflanzen, enthaltend die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern oder von Antikörper-ähnlichen Proteinen gegen bei der Interaktion der Pflanze mit Mikroorganismen entstehende Signalmoleküle oder deren wesentliche Strukturmerkmale.

6. Pathogenresistente transgene Pflanzen nach Anspruch 5, enthaltend die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern oder von Antikörper-ähnlichen Proteinen gegen bei der Interaktion der Pflanze mit Mikroorganismen entstehendes HSL oder dessen wesentliche Strukturmerkmale.

7. Pathogenresistente transgene Pflanzen nach Anspruch 5 und 6, enthaltend die genetische Information von bindenden oder katalytischen Antikörpern oder von Antikörper-ähnlichen Proteinen gegen bei der Interaktion der Pflanze mit Mikroorganismen entstehende Homoserinlactonring-Derivate.

8. Verfahren zur Züchtung von pathogenresistenten transgenen Pflanzen, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Herstellung von bindenden oder katalytischen Antikörpern oder von Antikörper-ähnlichen Proteinen gegen Signalmoleküle von Pflanze/Mikroorganismus-Interaktionen oder deren wesentliche Strukturmerkmale,
- Isolierung der genetischen Information für diese Antikörper,
- Transfer dieser Information in Pflanzen und
- Züchtung der Pflanze bis zur Erbbeständigkeit.

9. Anwendung von bindenden oder katalytischen Antikörpern oder von Antikörper-ähnlichen Proteinen, die gegen die Expression von Pathogenitätsfaktoren regulierende Moleküle gerichtet sind, in Wirt-Pathogen-Interaktionen bei Pflanzen.

- Le rseite -